

University of Groningen

Structure of p-hydroxybenzoate hydroxylase

Weijer, Wicher Jan

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:

1983

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Weijer, W. J. (1983). *Structure of p-hydroxybenzoate hydroxylase*. s.n.

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

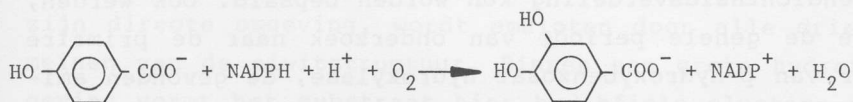
Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

SAMENVATTING

Het enzym p-hydroxybenzooaat hydroxylase katalyseert de reactie:



en maakt deel uit van een microbiële afbraakweg (β-ketoadi-paat route) waarlangs verschillende aromatische verbindingen worden verwerkt. Het enzym - een dimeer met twee identieke subunits - bevat de prosthetische groep flavine adenine dinucleotide (FAD). De door NADPH gereduceerde vorm van dit nucleotide is in staat een covalente binding met zuurstof aan te gaan, met als gevolg dat de O-O binding van zuurstof wordt gesplitst. Eén atoom van de zuurstof wordt als hydroxylgroep geïncorporeerd in het substraat p-hydroxybenzooaat, terwijl het andere atoom wordt gereduceerd tot water.

Een in Nederland uitgevoerd onderzoek naar de relatie tussen de functie en structuur van p-hydroxybenzooaat hydroxylase werd gestart in Wageningen door de groep van Dr. F. Müller (Biochemisch Laboratorium, Landbouwhogeschool Wageningen). In Groningen werd de drie-dimensionale kristalstructuur van het enzym-substraat complex opgehelderd bij een oplossend vermogen van 0.25 nm door R.K. Wierenga (dissertatie, Rijksuniversiteit Groningen, 1978) in de groep van J. Drenth en W.G.J. Hol (Laboratorium voor Chemische Fysica, Rijksuniversiteit Groningen).

Voor een volledige en betrouwbare interpretatie van de electronendichtheidsverdeling van p-hydroxybenzooaat hydroxylase is kennis van de aminozuurvolgorde een vereiste. Deze volgorde werd eveneens in Groningen bepaald, in de groep van J.J. Beintema (Biochemisch Laboratorium, Rijksuniversiteit Groningen). De strategie voor de bepaling van de aminozuurvolgorde is vanaf het begin geweest, om zoveel mogelijk gebruik te maken van de informatie die uit de bestaande elec-

tronendichtheidsverdeling kon worden verkregen. Splitsing van het eiwit met cyaanbromide (CNBr) leverde een beperkt aantal fragmenten op, waardoor op relatief eenvoudige wijze de onderlinge rangschikking van deze fragmenten op grond van de electronendichtheidsverdeling kon worden bepaald. Ook werden, gedurende de gehele periode van onderzoek naar de primaire structuur van p-hydroxybenzooat hydroxylase, de gevonden aminozuurvolgordes van de afzonderlijke CNBr-peptiden en de daarbij behorende electronendichtheidsverdelingen aan elkaar getoetst. In het algemeen werd hierbij een zeer goede overeenstemming waargenomen.

Bepaling van ongeveer de helft van de aminozuurvolgorde van het enzym was het onderwerp van het promotieonderzoek van J. Hofsteenge (dissertatie, Rijksuniversiteit Groningen, 1981). Dit laatste werk vormde de basis en het uitgangspunt van het in dit proefschrift beschreven onderzoek aan de primaire structuur van p-hydroxybenzooat hydroxylase.

Als een laatste stap in de voltooiing van de primaire structuurbepaling van p-hydroxybenzooat hydroxylase werd de aminozuurvolgorde bepaald van het grootste CNBr-fragment (166 aminozuren), dat het middelste gedeelte beslaat van de primaire structuur van het eiwit. Hiermee werd de volledige primaire en tertiaire structuur van p-hydroxybenzooat hydroxylase bekend. Het eiwit is opgebouwd uit 394 aminozuren, en het molecuulgewicht van de polypeptideketen berekend op grond van de volgorde bedraagt 44.299.

Bij de bepaling van de aminozuurvolgordes van de CNBr-fragmenten werden voornamelijk enzymatische splitsingsmethoden toegepast. Hierbij werden bekende enzymen zoals trypsine, proteinase uit *Staphylococcus aureus* V8, thermolysine en chymotrypsine gebruikt. Een nog weinig onderzocht proteolytisch enzym, endoproteïnase Lys-C uit *Lysobacter enzymogenes*, kon nuttig gebruikt worden bij de bepaling van de aminozuurvolgorde van het grootste CNBr-fragment. Behalve op dit CNBr-fragment werd de splitsingsspecificiteit van dit enzym getest op ribonuclease. Endoproteïnase Lys-C bleek bij voorkeur aan de carboxyl-zijde van lysineresten te splitsen.

Door inpassing van het grootste CNBr-fragment in de electronendichtheidsverdeling werden de gedeelten van de polypeptideketen die betrokken zijn bij de binding van FAD en het substraat p-hydroxybenzooat geïdentificeerd. Het actieve centrum, dat wordt gevormd door de flavine met het substraat in zijn directe omgeving, wordt omsloten door alle drie de domeinen van de eiwitstructuur. Binnen een grote hydrofobe omgeving vormt het substraat hier hydrofiele clusters door interactie van zijn hydroxylgroep met de hydroxylgroepen van twee tyrosineresten. Bovendien vormt de carboxylgroep van het substraat vormt een zoutbrug met een argininerest van het enzym. De flavine wordt gefixeerd door enkele waterstofbruggen en plaatselijke hydrofobe interacties met het eiwit, terwijl het op enkele andere plaatsen wordt omgeven door watermoleculen. De structurele gegevens van het enzym-substraat-complex vormden de basis voor enige beschouwingen over het reactiemechanisme van het enzym.

De rol van onder andere cysteineresten bij de katalytische werking van het enzym werd onderzocht in de groep van Dr. F. Müller (Biochemisch Laboratorium, Landbouwhogeschool Wageningen) door middel van chemische modificatiestudies. Uit de door hen gesynthetiseerde derivaten van p-hydroxybenzooat hydroxylase werden peptiden met gemodificeerde cysteine geïsoleerd (onder andere met behulp van HPLC = hoge efficiënte vloeistofchromatografie) en door middel van volgordeonderzoek gekarakteriseerd. Hierdoor was het mogelijk de plaats van de gemodificeerde cysteineresten in de primaire en tertiaire structuur aan te geven.

8393
1983₁₂₅